

**JP05284972A**

## MicroPatent Report

## GENE DNA CODING THREONINE SYNTHASE AND ITS USE

**[71] Applicant: MITSUBISHI  
PETROCHEM CO LTD**

**[72] Inventors:** KOHAMA KEIKO;  
KOBAYASHI MIKI;  
KURUSU YASUROU;  
YUGAWA HIDEAKI

**[21] Application No.: JP04085174**

**[22] Filed: 19920407**

**[43] Published: 19931102**

[illegible]

**Go to Fulltext**

**[57] Abstract:**

**PURPOSE:** To provide a new gene DNA useful for the production of L-threonine.  
**CONSTITUTION:** A gene DNA coding threonine synthase (E.C.4.2.99.2), originated from *Brevibacterium flavum* belonging to coryne-form bacteria and having the DNA base sequence of e.g. formula. It can be produced by cloning a coryne-form bacterial strain capable of producing threonine synthase, especially *Brevibacterium flavum* MJ233 (FERM BP-1497).  
**COPYRIGHT:** (C)1993,JPO&Japio

**[51] Int'l Class:** C12N01560 C12N00121 C12P01308 C12N01560  
C12R00115 C12N00121 C12R00115 C12P01308 C12R00115

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-284972

(43)公開日 平成5年(1993)11月2日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/60	Z N A	7236-4B		
1/21				
C 1 2 P 13/08	A	8931-4B		
// (C 1 2 N 15/60		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00	A

審査請求 未請求 請求項の数7(全 15 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平4-85174	(71)出願人	000006057 三菱油化株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
(22)出願日	平成4年(1992)4月7日	(72)発明者	小浜 恵子 茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号 三菱油化株式会社筑波総合研究所内
		(72)発明者	小林 幹 茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号 三菱油化株式会社筑波総合研究所内
		(72)発明者	久留主 泰朗 茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号 三菱油化株式会社筑波総合研究所内
		(74)代理人	弁理士 山本 隆也

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 スレオニンシンターゼをコードする遺伝子DNA及びその利用

(57)【要約】

【構成】 プレバクテリウム・フラバムMJ-233からスレオニンシンターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を単離し、この遺伝子の塩基配列を決定した。

【効果】 このスレオニンシンターゼをコードする遺伝子DNAを導入したコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドで形質転換されたプレバクテリウム・フラバムMJ233-t h sのL-スレオニンの産生能は著しく増加した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コリネ型細菌に属するブレヴィバクテリウ

ム・フラバム (*Brevibacterium fla*

vum) 由来のスレオニンシンターゼ (E. C. 4. 2. 99. 2.) をコードする遺伝子DNA。

【請求項2】 次のDNA塩基配列

```

GTGGACTACA TTTCGACGCG TGATGCCAGC CGTACCCCTG CCGCTTCAG TGATATTTG 60
CTGGGCGGTC TAGCACCAGA CGCGGCGCTA TAACCTACCC TCACTAGAT 120
GATGCCGAGC TGAGTAAATG GCGTGAGGTA TTAGCCAACG AAGGATACGC AGCTTTGGCT 180
CGTGAAGTTA TCTCCCTGTT TGTGATGAC ATCCGAGTAG AAGACATCAA GGCGATCACC 240
GCACGCGCCT ACACTACCC GAAGTTCAAC AGCGAAGACA TCGTTCTGT CACCGAATC 300
GAGGACAACA TTTACCTGGG CCACCTTTCC GAAGGCCCAA CCGCTGCATT CAAAGACATG 360
GCCATGCAGC TGCTCGGCGA ACTTTTCGAA TACGAGCTTC GCGCGCGCAA CGAAACCATC 420
AACATCCTAG GCGCTACCTC TGCGGATACC GGCTCCTCTG CGGAATACGC CATGCGCGGC 480
CGCGAGGAA TCGCGTATT CATGCTGACC CCAGCTGGCC GCATGACCCC ATTCCAGCAA 540
GCACAGATGT TTGGCCTTGA CGATCCAAAC ATCTTCAACA TCGCCCTCGA CGGCGTTTTT 600
GACGATTGCC AAGACGTAGT CAAGGCTGTC TCCGCCGAGC CGGAATTTAA AAAAGACAAC 660
CGCATGGTG CCGTGAATC CATCAACTGG GCTCGCTCA TGGCACAGGT TGTGTACTAC 720
GTTTCTCAT GGATCCGAC CACAACCAGC AATGACCAA AGGTCAGCTT CTCGTACCA 780
ACCGCAACT TCGGTGACAT TTGGCGAGGC CACATCGCCC GCCAAATGGG ACTTOCATC 840
GATCGCCTCA TCGTGGCCAC CAACGAAAAC GATGTGCTCG ACGAGTTCTT CGTACCGGC 900
GACTACCGAG TCCGAGCTC CGCAGACACC CACGAGACCT CCTCACCTTC GATGGATATC 960
TCCCGCGCCT CCAACTTCCA GCGTTTCATC TTGACCTGC TCGGCCGCGA CGCCACCGC 1020
GTCAACGATC TATTTGGTAC CCAGGTTCCG CAAGCGGAT TCTCACTGGC TGATGACGCC 1080
AACTTTGAAA AGGCTGCAGC AGAATACGGT TTGCTCCG GACGATCCAC CCATGCTGAC 1140
CGTGTGCAA CCATCGCTGA CGTGATTCC CGCTCGAG TACTAATCGA TCCCACACC 1200
GCCGACGCG TTCACTGGC AGCCAGTGG AGGACGAGG TCAACACCC AATCATGTC 1260
CTAGAACTG CACTCCAGT GAAATTTGCC GACACCATC TCGAAGCAAT TGGTGAAGCA 1320
CCTCAAACTC CAGAGCGTTT CGCGCGATC ATGATGCTC CATTCAAGGT TTCCGACCTA 1380
CCAAACGACA CCGATGCAGT TAAGCAGTAC ATAGTCGATG CGATTGCAAG CACTTCCGTG 1440
AAGTAA 1446

```

で示されるスレオニンシンターゼ (E. C. 4. 2. 99. 2.) をコードする遺伝子DNA。

【請求項3】 次のアミノ酸配列

```

Val Asp Tyr Ile Ser Thr Arg Asp Ala Ser Arg Thr Pro Ala Arg Phe
1           5           10          15
Ser Asp Ile Leu Leu Gly Gly Leu Ala Pro Asp Gly Gly Leu Tyr Leu
20          25          30
Pro Ala Thr Tyr Pro Gln Leu Asp Asp Ala Gln Leu Ser Lys Trp Arg
35          40          45
Glu Val Leu Ala Asn Glu Gly Tyr Ala Ala Leu Ala Ala Glu Val Ile
50          55          60
Ser Leu Phe Val Asp Asp Ile Pro Val Glu Asp Ile Lys Ala Ile Thr
65          70          75          80
Ala Arg Ala Tyr Thr Tyr Pro Lys Phe Asn Ser Glu Asp Ile Val Pro
85          90          95
Val Thr Glu Leu Glu Asp Asn Ile Tyr Leu Gly His Leu Ser Glu Gly
100         105         110
Pro Thr Ala Ala Phe Lys Asp Met Ala Met Gln Leu Leu Gly Glu Leu
115         120         125
Phe Glu Tyr Glu Leu Arg Arg Arg Asn Glu Thr Ile Asn Ile Leu Gly
130         135         140
Ala Thr Ser Gly Asp Thr Gly Ser Ser Ala Glu Tyr Ala Met Arg Gly
145         150         155         160

```

Arg Glu Gly Ile Arg Val Phe Met Leu Thr Pro Ala Gly Arg Met Thr  
 165 170 175  
 Pro Phe Gln Gln Ala Gln Met Phe Gly Leu Asp Asp Pro Asn Ile Phe  
 180 185 190  
 Asn Ile Ala Leu Asp Gly Val Phe Asp Asp Cys Gln Asp Val Val Lys  
 195 200 205  
 Ala Val Ser Ala Asp Ala Glu Phe Lys Lys Asp Asn Arg Ile Gly Ala  
 210 215 220  
 Val Asn Ser Ile Asn Trp Ala Arg Leu Met Ala Gln Val Val Tyr Tyr  
 225 230 235 240  
 Val Ser Ser Trp Ile Arg Thr Thr Thr Ser Asn Asp Gln Lys Val Ser  
 245 250 255  
 Phe Ser Val Pro Thr Gly Asn Phe Gly Asp Ile Cys Ala Gly His Ile  
 260 265 270  
 Ala Arg Gln Met Gly Leu Pro Ile Asp Arg Leu Ile Val Ala Thr Asn  
 275 280 285  
 Glu Asn Asp Val Leu Asp Glu Phe Phe Arg Thr Gly Asp Tyr Arg Val  
 290 295 300  
 Arg Ser Ser Ala Asp Thr His Glu Thr Ser Ser Pro Ser Met Asp Ile  
 305 310 315 320  
 Ser Arg Ala Ser Asn Phe Glu Arg Phe Ile Phe Asp Leu Leu Gly Arg  
 325 330 335  
 Asp Ala Thr Arg Val Asn Asp Leu Phe Gly Thr Gln Val Arg Gln Gly  
 340 345 350  
 Gly Phe Ser Leu Ala Asp Asp Ala Asn Phe Glu Lys Ala Ala Ala Glu  
 355 360 365  
 Tyr Gly Phe Ala Ser Gly Arg Ser Thr His Ala Asp Arg Val Ala Thr  
 370 375 380  
 Ile Ala Asp Val His Ser Arg Leu Asp Val Leu Ile Asp Pro His Thr  
 385 390 395 400  
 Ala Asp Gly Val His Val Ala Arg Gln Trp Arg Asp Glu Val Asn Thr  
 405 410 415  
 Pro Ile Ile Val Leu Glu Thr Ala Leu Pro Val Lys Phe Ala Asp Thr  
 420 425 430  
 Ile Val Glu Ala Ile Gly Glu Ala Pro Gln Thr Pro Glu Arg Phe Ala  
 435 440 445  
 Ala Ile Met Asp Ala Pro Phe Lys Val Ser Asp Leu Pro Asn Asp Thr  
 450 455 460  
 Asp Ala Val Lys Gln Tyr Ile Val Asp Ala Ile Ala Asn Thr Ser Val  
 465 470 475 480  
 Lys

で示されるスレオニンシンターゼ (E. C. 4. 2. 9 9. 2.) をコードする遺伝子DNA。

【請求項4】 請求項1～3のいずれかに記載の遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド。

【請求項5】 請求項1～3のいずれかに記載の遺伝子DNAと、コリネ型細菌内で複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNAを保有する組換えプラスミド。

【請求項6】 請求項5記載の組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌。

【請求項7】 グルコースを、請求項6記載のコリネ型細菌の培養菌体又は菌体処理物と接触させてL-スレオニンを生成せしめることを特徴とするL-スレオニンの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、スレオニンシンターゼ (E. C. 4. 2. 9 9. 2.) をコードする遺伝子を含むコリネ型細菌に属するプレバクテリウム・フラバ

ム (*Brevibacterium flavum*) 由来の遺伝子DNA、該遺伝子DNAを含む組換えプラスミド、該プラスミドで形質転換されたコリネ型細菌、及び該コリネ型細菌を用いるL-リジンの製造法に関する。

【0002】L-リジンは、必須アミノ酸として蛋白質中にその存在が知られ、医薬や食品添加物として用いられている。

【0003】

【従来の技術】従来、L-スレオニンの工業的製造法としては、グルタミン生産菌であるコリネ型細菌の各種栄養要求株、各種薬剤耐性株、各種薬剤感受性株を用いてL-スレオニンを製造する方法が知られている【例えば、特開昭47-19087号公報、特公昭54-32070号公報、特開昭54-92692号公報等参照】。また、組換え菌を用いた製造法も提案されている【特開昭58-126789号公報、特開昭60-30693号公報、特開昭62-186795号公報等参照】。しかしながら、従来提案されている方法によるL-スレオニンの製造法では、対糖収率が低く及び/又はL-スレオニンの蓄積に限界があり、新たな観点から、遺伝子工学的手法による菌株の改良等を含め、L-スレオニンをより効率的に生成させる方法の提供が強く求められている。

【0004】一方、スレオニンシンターゼ (E. C. 4. 2. 99. 2.) をコードする遺伝子としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 由来の遺伝子 [Nucleic Acids Research 11, p7331~p7345参照] がよく研究されている。また、グラム陽性細菌由来のスレオニンシンターゼ (E. C. 4. 2. 99. 2.) としては、プレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*)、コリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) 等が知られている [Nucleic Acids Research 16, p9859, 1988; Molecular Microbiology, 4, p1693~p1702, 1990参照]。しかしながら、プレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) 由来のスレオニンシンターゼ (E. C. 4. 2. 99. 2.) をコードする遺伝子については従来の報告例は見当たらない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、プレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) 由来のスレオニンシンターゼ (E. C. 4. 2. 99. 2.) をコードする遺伝子を単離し、該遺伝子を同種であるコリネ型細菌に導入し、該コリネ型細菌を用いて、新たな観点から効率的にL-

スレオニンを製造することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、プレビバクテリウム・フラバム染色体よりスレオニンシンターゼ遺伝子を単離し、該遺伝子を適当なベクタープラスミドに導入して、コリネ型細菌を形質転換し、該形質転換されたコリネ型細菌を用いると、効率的にL-スレオニンを製造しうることを見出し本発明を完成するに至った。

【0007】かくして本発明によれば

- (1) コリネ型細菌に属するプレビバクテリウム・フラバム由来のスレオニンシンターゼをコードする遺伝子DNA;
- (2) 該遺伝子DNAが導入された組換えプラスミド;
- (3) 該組換えプラスミドで形質転換されたコリネ型細菌;及び
- (4) 該形質転換されたコリネ型細菌を用い、グルコースを原料としてL-スレオニンを製造する方法が提供される。

【0008】以下、本発明についてさらに詳細に説明する。本発明の「スレオニンシンターゼをコードする遺伝子DNA」とは、ホスホモセリンよりリン酸を解離させる酵素、すなわちスレオニンシンターゼ (E. C. 4. 2. 99. 2.) をコードする遺伝子DNAを意味するものである。スレオニンシンターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片 (以下、これを「A断片」と略称することがある) は、その塩基配列が決定された後においては合成することも可能であるが、通常はスレオニンシンターゼ生産性微生物からクローニングされる場合が多く、その供給源となる微生物としては、コリネ型細菌、殊にプレビバクテリウム・フラバム (*Brevibacterium flavum*) MJ233 (FERM BP-1497) およびその由来株が有利に使用される。

【0009】これらの供給源微生物からA断片を調製するための基本的操作の一例を述べれば次のとおりである: A断片は、上記コリネ型細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497) 株の染色体上に存在し、この染色体を適当な制限酵素で切断することにより生ずる切断断片の中から以下に述べる方法で分離、取得することができる。

【0010】まず、プレビバクテリウム・フラバムMJ-233株の培養物から染色体DNAを抽出する。この染色体DNAを適当な制限酵素、例えばSph Iを用いて染色体DNAを完全に分解する。得られるDNA断片をクローニングベクター、例えばpHSG399 (宝酒造製) に挿入し、このベクターを用いて、スレオニンシンターゼ遺伝子が欠損したL-スレオニン要求性大腸菌 (エシェリヒア・コリ) 変異株CGSC5077 [エシェリヒア・コリ ジエネテック・ストック センター

(*Escherichia coli* Genetic Stock Center)、デパートメントオブバイオロジー、エールユニバーシティ (Department of Biology, Yale University); P. O. Box 6666 New Haven, CT 06511-744, U. S. A. 保存菌株) を形質転換し、選択培地に塗抹することにより、形質転換株を取得する。

【0011】得られる形質転換株よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたプレバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。かくして得られるA断片をさらに適当な制限酵素を用いて切断し、得られるDNA断片を、大腸菌で複製可能なベクタープラスミドに挿入し、このベクタープラスミドを、通常用いられる形質転換法、例えば、塩化カルシウム法、電気パルス法等による形質転換により、前記スレオニンシンター

ーゼが欠損したL-スレオニン要求性大腸菌変異株CG SC5077に導入し、選択培地に塗抹する。

【0012】得られる形質転換体よりプラスミドDNAを抽出し、制限酵素で解析することにより挿入されたプレバクテリウム・フラバムMJ-233株染色体由来のA断片を確認・取得することができる。このようにして得られるA断片の一つは、上記プレバクテリウム・フラバムMJ-233株の染色体DNAを制限酵素Sph Iの完全分解により切り出すことによって得られる大きさが約2.6 kbのDNA断片を挙げることができる。

【0013】この約2.6 kbのスレオニンシンターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片を、各種の制限酵素で切断したときの認識部位数及び切断断片の大きさを下記第1表に示す。

【0014】

【表1】

第 1 表		
制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BamHI	1	1.2, 1.4
PstI	1	1.0, 1.6
DdeI	2	0.5, 0.7, 1.4
MluI	1	0.6, 2.0
XhoI	1	0.8, 1.8
HincII	2	0.1, 0.9, 1.6

【0015】なお、本明細書において、制限酵素による「認識部位数」は、DNA断片又はプラスミドを、制限酵素の存在下で完全分解し、それらの分解物をそれ自体既知の方法に従い1%アガロースゲル電気泳動および5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、分離可能な断片の数から決定した値を採用した。

【0016】また、「切断断片の大きさ」及びプラスミドの大きさは、アガロースゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのラムダファージ ( $\lambda$  phage) のDNAを制限酵素Hind IIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一アガロースゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、また、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いる場合には、エシェリヒア・コリのファイ・エックス174ファージ ( $\phi$  x174 phage) のDNAを制限酵素Hae IIIで切断して得られる分子量既知のDNA断片の同一ポリアクリルアミドゲル上での泳動距離で描かれる標準線に基づき、切断DNA断片又はプラスミドの各DNA断片の大きさを算出する。プラスミドの大きさは、切断断片それぞれの大きさを加算して求める。なお、各DNA断片の大きさの決定において、1 kb以上の断片の大きさについては、1%アガロースゲル電気泳動によって得られる結果を採用し、約0.1 kbから1 kb未満の断片の大きさについては4%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られる結果を採用した。

【0017】一方、上記のプレバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAを制限酵素Sph Iによって切断することにより得られる大きさが約2.6 kbのDNA断片については、その塩基配列をプラスミドpUC118および/またはpUC119 (宝酒造製) を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法 (dideoxy chain termination法, Sanger, F. et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, p5463, 1977) により決定することができる。このようにして決定した上記約2.6 kbのDNA断片の塩基配列のオープンリーディングフレームの存在から決定したスレオニンシンターゼをコードする遺伝子は、後記配列表の配列番号: 1に示す配列を有するものであり、481個のアミノ酸をコードする1443の塩基対から構成されている。

【0018】上記した後記配列表の配列番号: 1に示す塩基配列を包含する本発明のスレオニンシンターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片は、天然のプレバクテリウム・フラバム染色体DNAから分離されたもののみならず、通常用いられるDNA合成装置、例えばベクマン社製System-1 Plusを用いて合成されたものであってもよい。

【0019】また、上記の如くプレバクテリウム・フラバムMJ-233の染色体DNAから取得される本発明のDNA断片は、スレオニンシンターゼをコードする

機能を実質的に損なうことがない限り、塩基配列の一部の塩基が他の塩基と置換されていてもよく又は削除されていてもよく、或いは新たに塩基が挿入されていてもよく、さらに塩基配列の一部が転位されているものであってもよく、これらの誘導体のいずれもが、本発明のスレオニンシンターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片に包含されるものである。

【0020】以上に詳述した大きさが約2.6 kbのDNA断片の制限酵素による切断点地図を図1に示す。本発明のスレオニンシンターゼをコードする遺伝子を含むDNA (A断片)は、適当なプラスミド、例えば、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターに導入することにより、コリネ型細菌内でスレオニンシンターゼの高発現可能な組換えプラスミドを得ることができる。

【0021】また、本発明のスレオニンシンターゼをコードする遺伝子を発現させるためのプロモーターはコリネ型細菌が保有する該遺伝子自身のプロモーターであることができるが、それに限られるものではなく、スレオニンシンターゼ遺伝子の転写を開始させるための原核生物由来の塩基配列であればいかなるプロモーターであってもよい。

【0022】本発明のA断片を導入することができる、コリネ型細菌内での複製増殖機能を司る遺伝子を少なくとも含むプラスミドベクターとしては、例えば、特開平3-210184号公報に記載のプラスミドpCRY30；特開平2-276575号公報に記載のプラスミドpCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX；特開平1-191686号公報に記載のプラスミドpCRY2及びpCRY3；特開昭58-67679号公報に記載のpAM330；特開昭58-77895号公報に記載のpHM1519；特開昭58-192900号公報に記載のpAJ655、pAJ611及びpAJ1844；特開昭57-134500号に記載のpCG1；特開昭58-35197号公報に記載のpCG2；特開昭57-183799号公報に記載のpCG4及びpCG11等を挙げることができる。

【0023】中でもコリネ型細菌の宿主-ベクター系で用いられるプラスミドベクターとしては、コリネ型細菌内でプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子とコリネ型細菌内でプラスミドの安定化機能を司る遺伝子とをもつものが好ましく、例えば、プラスミドpCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE及びpCRY3KX等が好適に使用される。

【0024】上記プラスミドベクターpCRY30を調製する方法としては、ブレヴィバクテリウム・スタチオニス (Brevibacterium stationi) 1FO12144 (FERM BP-2515) か

らプラスミドpBY503 (このプラスミドの詳細については特開平1-95785号公報参照) DNAを抽出し、制限酵素XhoIで大きさが約4.0 kbのプラスミドの複製増殖機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出し、制限酵素EcoRIおよびKpnIで大きさが約2.1 kbのプラスミドの安定化機能を司る遺伝子を含むDNA断片を切り出す。これらの両断片をプラスミドpHSG298 (宝酒造製) のEcoRI、KpnI部位及びSalI部位に組み込むことにより、プラスミドベクターpCRY30を調製することができる。

【0025】次に、上記プラスミドベクターへの本発明のA断片の導入は、例えばプラスミドベクター中に1個所だけ存在する制限酵素部位を、該制限酵素で開裂し、そこに前記A断片および開裂したプラスミドベクターを必要に応じてS1ヌクレアーゼで処理して平滑末端とするか、または適当なアダプターDNAの存在下にDNAリガーゼ処理で連結させることにより行うことができる。

【0026】プラスミドpCRY30への本発明のA断片の導入は、プラスミドpCRY30を制限酵素EcoRIで開裂させ、そこに前記スレオニンシンターゼをコードする遺伝子を含むDNA断片 (A断片) をDNAリガーゼで連結させることにより行うことができる。

【0027】かくして造成されるプラスミドpCRY30に本発明の大きさが約2.6 kbのA断片を導入した組換えプラスミドは、L-スレオニンの製造に好適に用いることができる組換えプラスミドの一つであり、本発明者らはこれをプラスミドpCRY30-thsと命名した。プラスミドpCRY30-thsの作成方法の詳細については、後記実施例4で説明する。

【0028】このようにして造成されるスレオニンシンターゼ遺伝子を含むコリネ型細菌内で複製増殖可能なプラスミドを、宿主微生物に導入して該微生物の培養物を用いてL-スレオニンを安定に効率よく生産することが可能となる。本発明によるプラスミドで形質転換しうる宿主微生物としては、コリネ型細菌、例えばブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497)、ブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233-AB-41 (FERM BP-1498)、ブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233-ABT-11 (FERM BP-1500)、ブレヴィバクテリウム・フラバムMJ-233-ABD-21 (FERM BP-1499) 等が挙げられる。

【0029】なお、上記のFERM BP-1498の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としてDL- $\alpha$ -アミノ酪氨酸耐性を積極的に付与されたエタノール酸化性微生物である (特公昭59-28398号公報参照)。また、FERMBP-1500の菌株は、FERM BP-1497の菌株を親株としたL- $\alpha$ -アミノ酪氨酸トランスアミナーゼ高活性変異株である (特開

昭62-51998号公報参照)。さらに、FERM BP-1499の菌株はFERM BP-1497の菌株を親株としたD- $\alpha$ -アミノ酪酸デアミナーゼ高活性変異株である(特開昭61-177993号公報参照)。

【0030】これらの微生物の他に、プレビバクテリウム・アンモニアゲネス(*Brevibacterium ammoniagenes*) ATCC6871、同ATCC13745、同ATCC13746;プレビバクテリウム・デバリカタム(*Brevibacterium divaricatum*) ATCC14020;プレビバクテリウム・ラクトファーメントム(*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869;コリネバクテリウム・グルタミカム(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC31831等を宿主微生物として用いることもできる。

【0031】なお、宿主としてプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来の菌株を用いる場合、本菌株が保有するプラスミドpBY502(特開昭63-36787号公報参照)のため、形質転換が困難である場合があるので、そのような場合には、本菌株よりプラスミドpBY502を除去することが望ましい。そのようなプラスミドpBY502を除去する方法としては、例えば、継代培養を繰り返すことにより自然に欠失させることも可能であるし、人為的に除去することも可能である[Bact. Rev. 36 p. 361~405(1972)参照]。上記プラスミドpBY502を人為的に除去する方法の一例を示せば次のとおりである。

【0032】宿主プレビバクテリウム・フラバムMJ-233の生育を不完全に阻害する濃度のアクリジンオレンジ(濃度:0.2~50 $\mu$ g/ml)もしくはエチジウムブロミド(濃度:0.2~50 $\mu$ g/ml)等を含む培地に、1ml当り約10細胞になるように植菌し、生育を不完全に阻害しながら約24時間約35℃で培養する。培養液を希釈後寒天培地に塗布し、約35℃で約2日培養する。出現したコロニーから各々独立にプラスミド抽出操作を行い、プラスミドpBY502が除去されている株を選択する。この操作によりプラスミドpBY502が除去されたプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株が得られる。

【0033】このようにして得られるプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来菌株への前記プラスミドの形質転換法としては、エシェリヒア・コリ及びエルビニア・カロトボラについて知られているように[Calvin, N. M. and Hanawalt, P. C., Journal of Bacteriology, 170, 2796(1988); Ito, K., Nishida, T. and Izaki, K., Agricultural and Biological C

hemistry, 52, 293(1988)参照]、DNA受容菌へのパルス波通電[Sato, Y. et al., Journal of Industrial Microbiology, 5, 159(1990)参照]によりプラスミドを導入することが可能である。

【0034】かくして得られる、本発明の、スレオニンシンターゼをコードする遺伝子DNAが導入されたプラスミド形質転換されたコリネ型細菌は、スレオニンシンターゼ高産生能を有しており、L-スレオニンの製造に好適に用いることができる。これらのコリネ型細菌の好適具体例としては、例えば前記したプラスミドpCRY30-thsを保有するプレビバクテリウム・フラバムMJ233-ths(FERM P-12858)を挙げることができる。

【0035】上記の方法で形質転換して得られるスレオニンシンターゼ産生能を有するコリネ型細菌、例えばプレビバクテリウム・フラバムMJ-233由来株の培養方法を以下に述べる。培養は炭素源、窒素源、無機塩等を含む通常の栄養培地で行うことができ、炭素源としては、例えばグルコース、エタノール、メタノール、廃糖蜜等が、そして窒素源としては、例えばアンモニア、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素等がそれぞれ単独もしくは混合して用いられる。また、無機塩としては、例えばリン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム等が用いられる。この他にペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステープリカー、カザミノ酸、ビオチン等の各種ビタミン等の栄養素を培地に添加することができる。

【0036】培養は、通常、通気攪拌、振盪等の好気条件下に、約20~約40℃、好ましくは約25℃~約35℃の温度で行うことができる。培養途中のpHは5~10、好ましくは7~8付近とすることができ、培養中のpH調整は酸又はアルカリを添加して行うことができる。培養開始時の炭素源濃度は、好ましくは1~5容量%、更に好ましくは2~3容量%である。また、培養期間は通常1~7日間とすることができ、最適期間は3日間である。

【0037】このようにして得られる培養物又は培養物から得られる菌体はL-スレオニンの製造に使用することができる。L-スレオニン生成反応においては、これらの培養物又は菌体をそのまま用いることができ、あるいは菌体に超音波処理等を加えた菌体破砕物、さらにそれから分離回収した粗酵素又は精製酵素として、あるいはそれらを適当な担体に固定化して用いることができる。以上に述べた如き菌体の破砕物や粗または精製酵素、固定化物等を本明細書ではまとめて「菌体処理物」という。

【0038】しかして本発明に従えば、グルコースを、上記培養菌体又は菌体処理物と接触させて、L-スレオ



ニンを生成せしめることからなるL-スレオニンの製造法が提供される。グルコースと上記培養菌体又は菌体処理物との接触は、通常の酵素反応と同様に、水性反応液中において、行なうことができる。

【0039】特に、本発明のプラスミドで形質転換しうる宿主微生物がビオチン要求性のコリネ型細菌である場合は、上記の如く調製された培養菌体またはその固定化物と、少なくともグルコースを含有しかつビオチンを含有しない水性反応液中で、グルコースを接触させてL-スレオニンを生成せしめるのが好適である。この場合、ビオチン要求性のコリネ型細菌はビオチンを実質的に含有しない水性反応液中では菌体増殖せずに、該菌体の保有する代謝系においてグルコースがエネルギー共役を伴う酵素反応を介して反応せしめられ、L-スレオニンが製造される。

【0040】上記水性反応液中のグルコース濃度は、通常0.1～5.0重量%の範囲内とすることができる。グルコースは反応中上記範囲内の濃度に維持されるように連続的または間欠的に水性反応液に添加するのが好ましい。

【0041】該水性反応液は、上記のように、グルコースを含有し且つビオチンを実質的に含有しない水あるいはリン酸またはトリ塩酸等の緩衝液であることもできるが、好ましくはグルコースを含有し且つビオチンを含有しない合成培地が用いられる。この合成培地には、酵母エキス、ペプトン、コーンステイープリカー等の天然栄養物質を含まない化学構造が既知の無機窒素源及び／又は無機物を含有する水溶液が包含される。本発明において用いられる合成培地の無機窒素源としては、例えばアンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等を例示することができ、また無機物としては、例えば、リン酸一水素カリウム、リン酸二水素カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸マンガン、硫酸鉄等を例示することができる。これらの無機窒素源および無機塩はそれぞれ、単独または2種以上混合して用いることができる。

【0042】本発明に従うL-スレオニン製造法において用いられる合成培地の一例を示すと次のとおりである： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2g/l； $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g/l； $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g/l； $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g/l； $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  20ppm； $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$  20ppm含有するpH7.6の水溶液。

【0043】本発明のL-スレオニン製造法において使用される前記のようにして調製された培養菌体又は菌体処理物の使用量は、特に制限されるものではないが、培地の容量を基準にして一般に1～50% (wt/vol)、好ましくは2～20% (wt/vol)の範囲内の濃度で使用することができる。上記したとおりの組成を有する水性反応液中における培養菌体又は菌体処理物

を用いる酵素反応は、一般に約20～約50℃、好ましくは約30～約40℃の温度で通常約10～約72時間行うことができる。

【0044】上記の如く酵素反応によって生成するL-スレオニンの水性反応液からの分離、精製は、それ自体既知の通常用いられる方法に従って行なうことができ、例えば、イオン交換樹脂処理法、晶析法等の方法を適宜組合せて行うことができる。また、本発明のコリネ型細菌は、通常の酵素法及び菌体増殖を伴う通常の発酵法によるL-スレオニンの製造法にも用いることができる。

【0045】

【実施例】以上に本発明を説明してきたが、下記の実施例によりさらに具体的に説明する。

#### 実施例1

プレバクテリウム・フラバムMJ-233由来のスレオニンシンターゼをコードする遺伝子を含むDNA (A断片)のクローニング

【0046】(A) プレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNAの抽出

半合成培地A培地〔組成：尿素2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  7g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g、 $\text{MgSO}_4$  0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  6mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$  6mg、酵母エキス2.5g、カザミノ酸5g、ビオチン200μg、塩酸チアミン200μg、グルコース20g、蒸留水1l〕1lにプレバクテリウム・フラバムMJ-233 (FERM BP-1497)を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を10mg/mlの濃度にリゾチームを含む10mM NaCl-20mMトリス緩衝液 (pH8.0)-1mM EDTA-2Na溶液15mlに懸濁した。次にプロテナーゼKを、最終濃度が100μg/mlになるように添加し、37℃で1時間保温した。さらにドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が0.5%になるように添加し、50℃で6時間保温して溶菌した。この溶菌液に、等量のフェノール/クロロホルム溶液を添加し、室温で10分間ゆるやかに振盪した後、全量を遠心分離 (5,000×g、20分間、10～12℃)し、上清画分を分取し、酢酸ナトリウムを0.3Mとなるように添加した後、2倍量のエタノールをゆっくりと加えた。水層とエタノール層の間に存在するDNAをガラス棒でまきとり、70%エタノールで洗浄した後、風乾した。得られたDNAに10mMトリス緩衝液 (pH7.5)-1mM EDTA-2Na溶液5mlに加え、4℃で一晩静置し、以後の実験に用いた。

【0047】(B) 組換え体の創製

上記(A)項で得たプレバクテリウム・フラバムMJ-233の全DNA溶液の90μlを制限酵素SphI 50unitsを用い、37℃で1時間反応させ完全分解した。このSphI分解DNAにクローニングベクターpUC119 (宝酒造より市販)を制限酵素SphI

で切断した後、脱リン酸化処理したものを混合し、50 mM トリス緩衝液 (pH 7.6)、10 mM ジチオスレイトール、1 mM ATP、10 mM  $MgCl_2$  及び T4 DNA リガーゼ 1 unit の各成分を添加し (各成分の濃度は最終濃度である)、4℃で15時間反応させ、結合させた。

【0048】(C) スレオニンシンターゼをコードする遺伝子を含むプラスミドの選択

上記遺伝子の選抜に用いたスレオニンシンターゼ欠損スレオニン要求性大腸菌変異株は、エシェリヒア・コリ CGSC 5077 (the C1001) である

( ( ) 内はスレオニンシンターゼ遺伝子型 (Genotype) を示す)。

【0049】上記 (B) 項で得られたプラスミド混液を用い、塩化カルシウム (Journal of Molecular Biology, 53, 159, 1970) により上記エシェリヒア・コリ CGSC 5077 株を形質転換し、クロラムフェニコール 50 mg を含む選択培地 ( $K_2HPO_4$  7 g,  $KH_2PO_4$  2 g, (NH

) $_2SO_4$  1 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1 g, グルコース 20 g 及び寒天 16 g を蒸留水 1 l に溶解) に塗抹した。

【0050】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミド DNA を抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミド pUC119 の長さ 3.2 kb の DNA 断片に加え、長さ 2.6 kb の挿入 DNA 断片が認められた。各種の制限酵素で切断したときの長さ約 2.6 kb の DNA 断片の認識部位数、および切断断片の大きさは前記表 1 に示したとおりであった。この DNA 断片の制限酵素切断点地図を図 1 に示す。

【0051】また上記で得たプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記第 2 表に示す。

【0052】

【表 2】

第 2 表 プラスミド pUC119-*th s*

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ (kb)
BamHI	2	1.4, 4.4
PstI	2	0.9, 4.9
HindIII	1	5.8

【0053】上記の制限酵素により特徴づけられるプラスミドを pUC119-*th s* と命名した。以上によりスレオニンシンターゼをコードする遺伝子を含む大きさが約 2.7 kb の DNA 断片 (SphI 断片) を得ることができた。

【0054】実施例 2

スレオニンシンターゼをコードする遺伝子の塩基配列の決定

実施例 1 の (C) 項で得られたスレオニンシンターゼをコードする遺伝子を含む長さが約 2.6 kb の DNA 断片について、その塩基配列をプラスミド pUC118 および pUC119 (宝酒造製) を用いるジデオキシヌクレオチド酵素法 (dideoxy chain termination 法) (Sahger, F. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463, 1977) により図 2 に示した戦略図に従って決定した。

【0055】その塩基配列中のオープンリーディングフレームの存在から、アスパルトキナーゼをコードする遺伝子は、後記配列表の配列番号: 1 に示す配列を有する 481 個のアミノ酸をコードする 1443 の塩基対より構成されていることが判明した。

【0056】実施例 3

コリネ型細菌内で複製し安定なプラスミドベクター pCRY30 の作成

(A) プラスミド pBY503 の調製

プラスミド pBY503 は、プレビバクテリウム・スタチオニス 1FO12144 (FERM BP-2515) から分離された分子量約 10 メガダルトンのプラスミドであり、特開平 1-95785 号公報に記載のようにして調製した。

【0057】半合成培地 A 培地 (尿素 2 g, (NH $_4$ ) $_2SO_4$  7 g,  $K_2HPO_4$  0.5 g,  $KH_2PO_4$  0.5 g,  $MgSO_4$  0.5 g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  6 mg,  $MnSO_4 \cdot 4 \sim 6H_2O$  6 mg, 酵母エキス 2.5 g, カザミノ酸 5 g, ビチオン 200  $\mu$ g, 塩酸チアミン 200  $\mu$ g, グルコース 20 g 及び蒸留水 1 l) 1 l に、プレビバクテリウム・スタチオニス 1FO12144 を対数増殖期後期まで培養し、菌体を集めた。得られた菌体を 10 mg/ml の濃度にリゾチームを含む緩衝液 (25 mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン, 10 mM の EDTA, 50 mM グルコース) 20 ml に懸濁し、37℃で1時間反応させた。反応液にアルカリ SDS 液 (0.2 N NaOH, 1% (W/V) SDS) 40 ml を添加し、緩やかに混和して室温にて15分間静置した。次に、この反応液に酢酸カリウム溶液 (5 M 酢酸カリウム溶液 60 ml, 酢酸 1 l, 5 ml, 蒸留水 28.5 ml の混合液) 30 ml を添加し、充分混和してから氷水中に15分間静置した。

【0058】溶菌物全量を遠心管に移し、4℃で10分間、15,000  $\times$  g の遠心分離にかけ、上澄液を得た。これに等量のフェノールクロロホルム液 (フェノ

ール：クロロホルム＝１：１混和液）を加え懸濁した後、遠心管に移し、室温下で５分間、 $15,000\times g$ の遠心分離にかけ、水層を回収した。水層に２倍量のエタノールを加え、 $-20^{\circ}\text{C}$ で１時間静置後、 $4^{\circ}\text{C}$ で１０分間、 $15,000\times g$ の遠心分離にかけ、沈澱を回収した。

【００５９】沈澱を減圧乾燥後、ＴＥ緩衝液〔トリス１０ｍＭ、ＥＤＴＡ １ｍＭ；ＨＣｌにてｐＨ８．０に調整〕２ｍｌに溶解した。溶解液に塩化セシウム溶液〔５倍濃度のＴＥ緩衝液１００ｍｌに塩化セシウム１７０ｇを溶解させた液〕１５ｍｌと１０ｍｇ／ｍｌエチジウムブロマイド溶液１ｍｌを加えて、密度を１．３９２ｇ／ｍｌに合わせた。この溶液を $12^{\circ}\text{C}$ で４２時間、 $116,000\times g$ の遠心分離を行った。

【００６０】プラスミドｐＢＹ５０３は紫外線照射により遠心管内で下方のバンドとして見いだされる。このバンドを注射器で遠心管の側面から抜きとることにより、プラスミドｐＢＹ５０３を含む分画液を得た。次いでこの分画液を等量のイソアミルアルコールで４回処理してエチジウムブロマイドを抽出除去し、その後にＴＥ緩衝液に対して透析を行った。得られたプラスミドｐＢＹ５０３を含む透析液に３Ｍ酢酸ナトリウム溶液を最終濃度３０ｍＭに添加した後、２倍量エタノールを加え、 $-20^{\circ}\text{C}$ で１時間静置した。この溶液を $15,000\times g$ の遠心分離にかけてＤＮＡを沈降させ、プラスミドｐＢＹ５０３を５０μｇ得た。

#### 【００６１】（Ｂ）プラスミドベクターｐＣＲＹ３０の作成

プラスミドｐＨＳＧ２９８（宝酒造製）０．５μｇを制限酵素ＳａｌⅠ（５units）を $37^{\circ}\text{C}$ で１時間反応させ、プラスミドＤＮＡを完全に分解した。上記（Ａ）項で調製したプラスミドｐＢＹ５０３の２μｇに制限酵素ＸｈｏⅠ（１unit）を $37^{\circ}\text{C}$ で３０分間反応させ、プラスミドＤＮＡを部分分解した。

【００６２】両者のプラスミドＤＮＡ分解物を混合し、制限酵素を不活性化するために $65^{\circ}\text{C}$ で１０分間加熱処理した後、該失活溶液中の成分が最終濃度として各々５０ｍＭトリス緩衝液ｐＨ７．６、１０ｍＭ  $\text{MgCl}_2$ 、１０ｍＭジチオスレイトール、１ｍＭ  $\text{ATP}$ 及びＴ４ＤＮＡリガーゼ１unitになるように各成分を強化し、 $16^{\circ}\text{C}$ で１５時間保温した。この溶液を用いてエシェリヒア・コリＪＭ１０９コンピテントセル（宝酒造製）を形質転換した。

【００６３】形質転換株は３０μｇ／ｍｌ（最終濃度）のカナマイシン、１００μｇ／ｍｌ（最終濃度）のIPTG（イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド）１００μｇ／ｍｌ（最終濃度）のX-gal（５-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド）を含むＬ培地（トリプトン１０ｇ、酵母エキス５ｇ、NaCl ５ｇ及び蒸留水１ｌ、ｐＨ７．

２）で $37^{\circ}\text{C}$ にて２４時間培養し、生育株として得られた。これらの生育株のうち、白いコロニーで生育してきたものを選択し、各々プラスミドをアルカリ-SDS法〔T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, "Molecular cloning"（１９８２）ｐ９０～９１参照〕により抽出した。

【００６４】その結果、プラスミドｐＨＳＧ２９８のＳａⅠ部位にプラスミドｐＢＹ５０３由来の約４．０ｋｂの断片が挿入されたプラスミドｐＨＳＧ２９８-oriが得られた。次に同様の方法を用い、前記（Ａ）項で得られたプラスミドｐＢＹ５０３ＤＮＡを制限酵素KpnⅠ及びEcoRⅠにて処理して得られる約２．１ｋｂのＤＮＡ断片を上記プラスミドｐＨＳＧ２９８-oriのKpnⅠ及びEcoRⅠ部位にクローニングし、プラスミドベクターｐＣＲＹ３０を調製した。

#### 【００６５】実施例４

プラスミドｐＣＲＹ３０-thsの作成及びコリネ型細菌の導入

実施例１の（Ｃ）項で得られたプラスミドｐUC119-ths 5μgを制限酵素SphⅠ 5units用い、 $37^{\circ}\text{C}$ で１時間反応させ分解したものと、EcoRⅠリンカー（宝酒造より市販）１μlを混合し、５０ｍＭトリス緩衝液（ｐＨ７．６）、１０ｍＭジチオスレイトール、１ｍＭ  $\text{ATP}$ 、１０ｍＭ  $\text{MgCl}_2$  およびＴ４ＤＮＡリガーゼ１unitの各成分を添加し（各成分の濃度は最終濃度である）、 $12^{\circ}\text{C}$ で１５時間反応させ結合させた。

【００６６】このＤＮＡを制限酵素EcoRⅠ 3unitsを用い $37^{\circ}\text{C}$ で１時間反応させ分解したものと、実施例３の（Ｂ）項で得られたプラスミドｐＣＲＹ３０ 1μgを制限酵素EcoRⅠ 1unitを用い、 $37^{\circ}\text{C}$ で１時間反応させ分解したものを混合し、５０ｍＭトリス緩衝液（ｐＨ７．６）、１０ｍＭジチオスレイトール、１ｍＭ  $\text{ATP}$ 、１０ｍＭ  $\text{MgCl}_2$  およびＴ４ＤＮＡリガーゼ１unitの各成分を添加し（各成分の濃度は最終濃度である）、 $12^{\circ}\text{C}$ で１５時間反応させ結合させた。このプラスミドを用いて、前記方法に従い前記エシェリヒア・コリCGSC5077株を形質転換し、カナマイシン５０μｇ／ｍｌを含む選択培地〔 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  7g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1g、グルコース２０g及び寒天１６gを蒸留水１ｌに溶解〕に塗抹した。

【００６７】この培地上の生育株を常法により液体培養し、培養液よりプラスミドＤＮＡを抽出し、該プラスミドを制限酵素により切断し、アガロースゲル電気泳動を用いて調べたところ、プラスミドｐＣＲＹ３０の長さ８．６ｋｂのＤＮＡ断片に加え、大きさ２．６ｋｂの挿入ＤＮＡ断片が認められた。上記の如く調製されたプラスミドＤＮＡを、電気パルス法を用いてコリネ型細菌へ

次のとおり形質転換した。

【0068】プレビバクテリウム・フラバム MJ-233 (FERM BP-1497) プラスミド pBY502 除去株を100mlの前記A培地で対数増殖初期まで培養し、ペニシリンGを1ユニット/mlになるように添加して、さらに2時間振盪培養し、遠心分離により菌体を集め、菌体を20mlのバルス用溶液(272mM Sucrose、7mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、1mM  $\text{MgCl}_2$  ; pH7.4)にて洗浄した。さらに菌体を遠心分離して集め、5mlのバルス用溶液に懸濁し、0.75mlの細胞と、前記で得られたプラスミドDNA溶液50 $\mu$ lとを混合し、水中にて20分間静置した。ジ

ーンバルサー(バイオラド社製)を用いて、2500ボルト、25 $\mu$ FDに設定し、パルスを加後氷中に20分間静置した。全量を3mlの前記A培地に移し30℃にて1時間培養後、カナマイシン15 $\mu$ g/ml(最終濃度)を含む前記A寒天培地に植菌し30℃で2~3日間培養した。出現したカナマイシン耐性株より、前記実施例3(A)項に記載の方法を用いてプラスミドを得た。このプラスミドを各種制限酵素で切断して、切断断片の大きさを測定した。その結果を下記第3表に示す。

【0069】

【表3】

第3表 プラスミド pCRY30-t h s

制限酵素	認識部位数	切断断片の大きさ(k b)
EcoRI	2	8.7、2.6
BamHI	2	3.3、8.0
KpnI	2	3.6、7.7
XhoI	2	2.9、8.4

【0070】上記制限酵素により特徴づけられるプラスミドをpCRY30-t h sと命名した。このプラスミドpCRY30-t h sの制限酵素による切断点地図を図3に示す。なお、プラスミドpCRY30-t h sにより形質転換されたプレビバクテリウム・フラバム MJ-233-t h sは、茨城県つくば市東1丁目1番3号の工業技術院微生物工業技術研究所に、平成4年3月10日付で：微工研菌寄第12858号(FERM P-12858)として寄託されている。

#### 【0071】実施例5

プラスミドpCRY30-t h sの安定性  
前記のA培地100mlを500ml容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌処理したものに、実施例4で得た形質転換株プレビバクテリウム・フラバム MJ233-t h sを植菌し、30℃にて24時間振盪培養を行った後、同様にして調製したA培地100mlを500ml容三角フラスコに分注し、120℃で15分間滅菌したもの、1ml当たり50cellsの割合になるように植菌し、同じく30℃にて24時間振盪培養を行った。次に遠心分離して集菌し、菌体を洗浄後、カナマイシンを15 $\mu$ g/mlの割合で添加したA培地及び無添加のA培地を用いて調製した平板培地に一定量塗抹し、30℃にて1日培養後生育コロニーをカウントした。

【0072】この結果、カナマイシン添加および無添加培地に生育したコロニーは同数であること、さらにA培地生育コロニーは全てカナマイシン添加培地に生育すること、すなわち該プラスミドの高度の安定性を確認した。

#### 【0073】実施例6

リースレオニンの生産

培地(尿素0.4%、硫酸アンモニウム1.4%、KH

$2\text{PO}_4$  0.05%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2ppm、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2ppm、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$  2ppm、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2ppm、 $\text{NaCl}$  2ppm、ビオチン200 $\mu$ g/l、チアミン $\cdot \text{HCl}$  100 $\mu$ g/l、カザミノ酸0.1%、酵母エキス0.1%)100mlを500ml容三角フラスコに分注、滅菌(滅菌後pH7.0)した後プレビバクテリウム・フラバム (Brevibacterium flavum) MJ233-t h s (FERM P-12858号)を植菌し、無菌的にグルコースを5g/lの濃度になるように加え、30℃にて2日間振盪培養を行った。

【0074】次に、本培養培地(グルコース5%、硫酸アンモニウム2.3%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.05%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2ppm、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$  2ppm、ビオチン200 $\mu$ g/l、チアミン $\cdot \text{HCl}$  100 $\mu$ g/l、カザミノ酸0.3%、酵母エキス0.3%)の1000mlを2l容通気攪拌槽に仕込み、滅菌(120℃、20分間)後、前記前培養物の20mlを添加して、回転数1000rpm、通気量1vvm、温度33℃、pH7.6にて24時間培養を行った。

【0075】培養終了後、培養物500mlから遠心分離にて集菌後、脱塩蒸留水にて2度洗浄した菌体を反応液[( $\text{NH}_4$ ) $_2\text{SO}_4$  2g/l ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g/l ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5g/l ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5g/l ;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2ppm ;  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 6\text{H}_2\text{O}$  2ppm ; チアミン塩酸塩100 $\mu$ g/l ; pH7.6]の1000mlに懸濁後、該懸濁液を2l容通気攪拌槽に仕込み、グルコース9g

を添加して、回転数300rpm、通気量0.1vvm、温度33℃、pH7.6にて24時間反応を行った。

【0076】反応終了後、遠心分離(4000rpm、15分間、4℃)にて除菌した上清液中のL-スレオニン进行量を、0.15g/lであった。この反応終了後の培養液500mlを、強酸性陽イオン交換樹脂(H<sup>+</sup>型)のカラムに通してL-スレオニンを吸着させ、水洗後、0.5Nアンモニア水で溶出させた後、L-スレオニン画分を濃縮し、冷エタノールでL-スレオニンの結晶を析出させた。その結果、50mgのL-スレオニン結晶を得た。

【0077】また、比較例として、同様の条件にて、ブレビバクテリウム・フラバム(*Brevibacterium flavum*) MJ-233 (FERM BP-1497)を培養し、同様の条件にて反応させた後上

清液中のL-スレオニンを定量した。その結果、上清液中のL-スレオニン生成量は0.1g/lであった。

【0078】

【配列表】配列番号: 1

配列の長さ1446

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: ブレビバクテリウム フラバム

株名: MJ233

配列の特徴

特徴を表す記号: peptide

存在位置: 1-1446

特徴を決定した方法: P

#### 配列

```

GTG GAC TAC ATT TCG ACG CGT GAT GCC AGC CGT ACC CCT GCC CGC TTC 48
Val Asp Tyr Ile Ser Thr Arg Asp Ala Ser Arg Thr Pro Ala Arg Phe
1 5 10 15
AGT GAT ATT TTG CTG GGC GGT CTA GCA CCA GAC GGC GGC CTA TAC CTG 96
Ser Asp Ile Leu Leu Gly Gly Leu Ala Pro Asp Gly Gly Leu Tyr Leu
20 25 30
CCT GCA ACC TAC CCT CAA CTA GAT GAT GCC CAG CTG AGT AAA TGG CGT 144
Pro Ala Thr Tyr Pro Gln Leu Asp Asp Ala Gln Leu Ser Lys Trp Arg
35 40 45
GAG GTA TTA GCC AAC GAA GGA TAC GCA GCT TTG GCT GCT GAA GTT ATC 192
Glu Val Leu Ala Asn Glu Gly Tyr Ala Ala Leu Ala Ala Glu Val Ile
50 55 60
TCC CTG TTT GTT GAT GAC ATC CCA GTA GAA GAC ATC AAG GCG ATC ACC 240
Ser Leu Phe Val Asp Asp Ile Pro Val Glu Asp Ile Lys Ala Ile Thr
65 70 75 80
GCA CGC GCC TAC ACC TAC CCG AAG TTC AAC AGC GAA GAC ATC GTT CCT 288
Ala Arg Ala Tyr Thr Tyr Pro Lys Phe Asn Ser Glu Asp Ile Val Pro
85 90 95
GTC ACC GAA CTC GAG GAC AAC ATT TAC CTG GGC CAC CTT TCC GAA GGC 336
Val Thr Glu Leu Glu Asp Asn Ile Tyr Leu Gly His Leu Ser Glu Gly
100 105 110
CCA ACC GCT GCA TTC AAA GAC ATG GCC ATG CAG CTG CTC GGC GAA CTT 384
Pro Thr Ala Ala Phe Lys Asp Met Ala Met Gln Leu Leu Gly Glu Leu
115 120 125
TTC GAA TAC GAG CTT CGC CGC CGC AAC GAA ACC ATC AAC ATC CTA GGC 432
Phe Glu Tyr Glu Leu Arg Arg Asn Glu Thr Ile Asn Ile Leu Gly
130 135 140
GCT ACC TCT GGC GAT ACC GGC TCC TCT GCG GAA TAC GCC ATG CGC GGC 480
Ala Thr Ser Gly Asp Thr Gly Ser Ser Ala Glu Tyr Ala Met Arg Gly
145 150 155 160
CGC GAG GGA ATC CGC GTA TTC ATG CTG ACC CCA GCT GGC CGC ATG ACC 528
Arg Glu Gly Ile Arg Val Phe Met Leu Thr Pro Ala Gly Arg Met Thr

```

	165	170	175	
CCA TTC CAG CAA GCA CAG ATG TTT GGC CTT GAC GAT CCA AAC ATC TTC	576			
Pro Phe Gln Gln Ala Gln Met Phe Gly Leu Asp Asp Pro Asn Ile Phe				
	180	185	190	
AAC ATC GCC CTC GAC GGC GTT TTC GAC GAT TGC CAA GAC GTA GTC AAG	624			
Asn Ile Ala Leu Asp Gly Val Phe Asp Asp Cys Gln Asp Val Val Lys				
	195	200	205	
GCT GTC TCC GCC GAC GCG GAA TTT AAA AAA GAC AAC CGC ATC GGT GCC	672			
Ala Val Ser Ala Asp Ala Glu Phe Lys Lys Asp Asn Arg Ile Gly Ala				
	210	215	220	
GTG AAC TCC ATC AAC TGG GCT CGC CTC ATG GCA CAG GTT GTG TAC TAC	720			
Val Asn Ser Ile Asn Trp Ala Arg Leu Met Ala Gln Val Val Tyr Tyr				
	225	230	235	240
GTT TCC TCA TGG ATC CGC ACC ACA ACC AGC AAT GAC CAA AAG GTC AGC	768			
Val Ser Ser Trp Ile Arg Thr Thr Thr Ser Asn Asp Gln Lys Val Ser				
	245	250	255	
TTC TCC GTA CCA ACC GGC AAC TTC GGT GAC ATT TGC GCA GGC CAC ATC	816			
Phe Ser Val Pro Thr Gly Asn Phe Gly Asp Ile Cys Ala Gly His Ile				
	260	265	270	
GCC CGC CAA ATG GGA CTT CCC ATC GAT CGC CTC ATC GTG GCC ACC AAC	864			
Ala Arg Gln Met Gly Leu Pro Ile Asp Arg Leu Ile Val Ala Thr Asn				
	275	280	285	
GAA AAC GAT GTG CTC GAC GAG TTC TTC CGT ACC GGC GAC TAC CGA GTC	912			
Glu Asn Asp Val Leu Asp Glu Phe Phe Arg Thr Gly Asp Tyr Arg Val				
	290	295	300	
CGC AGC TCC GCA GAC ACC CAC GAG ACC TCC TCA OCT TCG ATG GAT ATC	960			
Arg Ser Ser Ala Asp Thr His Glu Thr Ser Ser Pro Ser Met Asp Ile				
	305	310	315	320
TCC CGC GCC TCC AAC TTC GAG CGT TTC ATC TTC GAC CTG CTC GGC CGC	1008			
Ser Arg Ala Ser Asn Phe Glu Arg Phe Ile Phe Asp Leu Leu Gly Arg				
	325	330	335	
GAC GCC ACC CGC GTC AAC GAT CTA TTT GGT ACC CAG GTT CGC CAA GCC	1056			
Asp Ala Thr Arg Val Asn Asp Leu Phe Gly Thr Gln Val Arg Gln Gly				
	340	345	350	
GGA TTC TCA CTG GCT GAT GAC GCC AAC TTT GAA AAG GCT GCA GCA GAA	1104			
Gly Phe Ser Leu Ala Asp Asp Ala Asn Phe Glu Lys Ala Ala Ala Glu				
	355	360	365	
TAC GGT TTC GCC TCC GGA CGA TCC ACC CAT GCT GAC CGT GTG GCA ACC	1152			
Tyr Gly Phe Ala Ser Gly Arg Ser Thr His Ala Asp Arg Val Ala Thr				
	370	375	380	
ATC GCT GAC GTG CAT TCC CGC CTC GAC GTA CTA ATC GAT CCC CAC ACC	1200			
Ile Ala Asp Val His Ser Arg Leu Asp Val Leu Ile Asp Pro His Thr				
	385	390	395	400
GCC GAC GGC GTT CAC GTG GCA CGC CAG TGG AGG GAC GAG GTC AAC ACC	1248			
Ala Asp Gly Val His Val Ala Arg Gln Trp Arg Asp Glu Val Asn Thr				
	405	410	415	
CCA ATC ATC GTC CTA GAA ACT GCA CTC CCA GTG AAA TTT GCC GAC ACC	1296			
Pro Ile Ile Val Leu Glu Thr Ala Leu Pro Val Lys Phe Ala Asp Thr				
	420	425	430	
ATC GTC GAA GCA ATT GGT GAA GCA CCT CAA ACT CCA GAG CGT TTC GCC	1344			

Ile Val Glu Ala Ile Gly Glu Ala Pro Gln Thr Pro Glu Arg Phe Ala  
 435 440 445  
 GCG ATC ATG GAT GCT CCA TTC AAG GTT TOC GAC CTA CCA AAC GAC ACC 1392  
 Ala Ile Met Asp Ala Pro Phe Lys Val Ser Asp Leu Pro Asn Asp Thr  
 450 455 460  
 GAT GCA GTT AAG CAG TAC ATA GTC GAT GCG ATT GCA AGC ACT TCC GTG 1440  
 Asp Ala Val Lys Gln Tyr Ile Val Asp Ala Ile Ala Asn Thr Ser Val  
 465 470 475 480  
 AAG TAA 1446  
 Lys

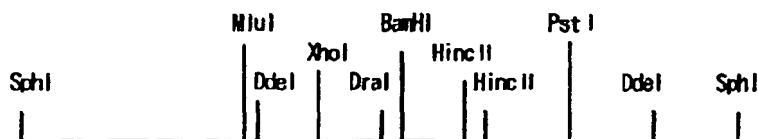
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のスレオニンシンターゼをコードする遺伝子を含む大きさが約2.6 kbのDNA断片の制限酵素による切断点地図。

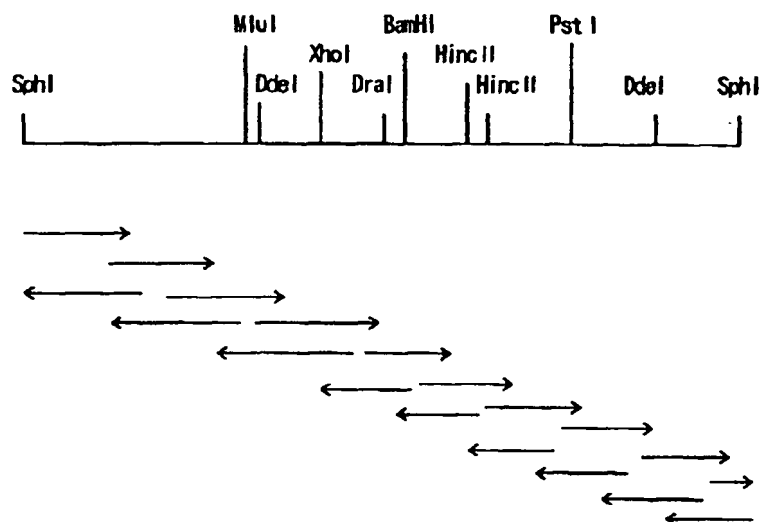
【図2】大きさが約2.6 kbの本発明DNA断片の塩基配列決定のための戦略図。

【図3】本発明のプラスミドpCRY30-thsの制限酵素による切断点地図。

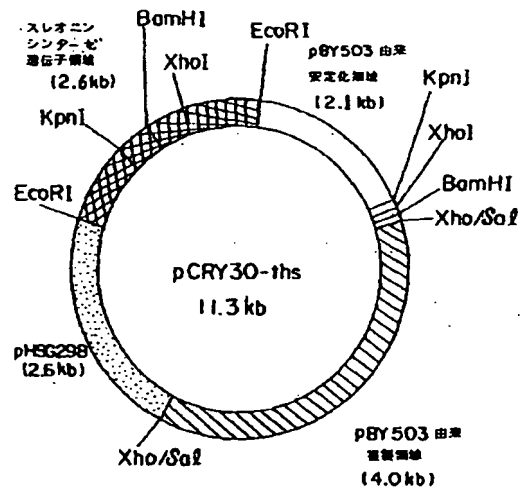
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 R 1:15)				
(C 1 2 N 1/21				
C 1 2 R 1:15)				
(C 1 2 P 13/08				
C 1 2 R 1:15)				

(72) 発明者 湯川 英明  
 茨城県稲敷郡阿見町中央8丁目3番1号  
 三菱油化株式会社筑波総合研究所内